

**Министерство здравоохранения Республики Беларусь
Витебский государственный медицинский университет**



«УТВЕРЖДАЮ»

**Витебского государственного
факультета Дружбы народов
медицинского университета
В.П. Дейкало**

2008 г.

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧИСЛА ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В КРОВИ ЭНДОТЕЛИОЦИТОВ

(МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ)

ВИТЕБСК, 2008

УДК 616-009.1-07:616:1(07)

Учреждения разработчики: Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет.

Авторы: **Козловский В.И., Солодков А.П., Мяделец О.Д., Акулёнок А.В.**

В методических рекомендациях представлены методы определения циркулирующих в крови эндотелиоцитов, обозначена их роль как маркера повреждения эндотелия, возможность их применения в оценке эффективности терапии больных артериальной гипертензией и прогнозе развития осложнений.

Методические рекомендации рассчитаны на студентов высших медицинских учебных заведений, врачей-лаборантов, терапевтов, кардиологов, научных работников, исследующих дисфункцию/повреждение эндотелия.

Рецензенты: д.м.н., профессор Юпатов Г.И., д.м.н., профессор Хапалюк А.В.

Методические рекомендации утверждены ЦУМС УО «Витебский государственный медицинский университет».

Сокращения:

АГ – артериальная гипертензия.

АД – артериальное давление.

АПФ – ангиотензин-превращающий фермент.

ИБС – ишемическая болезнь сердца.

ИМ – инфаркт миокарда.

ЦЭК – циркулирующие в крови эндотелиоциты.

ЦЭК-п – циркулирующие эндотелиальные клетки-предшественники.

NO – монооксид азота.

Библиотека ВГМУ



Оглавление:

ВВЕДЕНИЕ.....	5
1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭНДОТЕЛИЯ.....	6
1.1. Морфология эндотелия.....	6
1.2. Функции эндотелия.....	8
2. ПРОИСХОЖДЕНИЕ ЦЭК	8
3. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЦЭК.....	11
3.1. Исторические аспекты определения ЦЭК.....	11
3.2. Метод иммуномагнитной изоляции ЦЭК	12
3.3. Изоляция ЦЭК по методу	13
3.4. Иммунофлюоресцентный метод оценки ЦЭК.....	13
3.5. Метод морфологической идентификации ЦЭК	14
3.6. Приготовление мазков ЦЭК.....	16
3.7. Гистохимические методы исследования ЦЭК.....	16
3.8. Оценка апоптотических и жизнеспособных ЦЭК.....	17
4. МОРФОЛОГИЯ ЦЭК.....	17
5. КЛИНИЧЕСКОЕ И ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ЦЭК У БОЛЬНЫХ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ.....	19
5.1. Число ЦЭК у здоровых и больных сердечно-сосудистыми заболеваниями.....	19
5.2. Изменение числа ЦЭК под влиянием медикаментозного лечения.....	21
5.3. Число ЦЭК как прогностический фактор неблагоприятных исходов у больных сердечно-сосудистыми заболеваниями.....	22
6. ОСНОВНЫЕ ЦЕЛИ ИССЛЕДОВАНИЯ УРОВНЯ ЦЭК.....	27
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	27
ЛИТЕРАТУРА.....	28

ВВЕДЕНИЕ

Эндотелий сосудов играет ведущую роль в регуляции сосудистой проницаемости, тонуса сосудов, коагуляции, обеспечении тканей пластическими и энергетическими продуктами, выведении продуктов метаболизма.

При повреждении эндотелия происходит анатомическое разрушение и десквамация эндотелиальных клеток от базальной мембраны сосуда. Повреждение эндотелия сопровождается нарушением вышеуказанных функций, что приводит к расстройству кровотока в различных органах и тканях.

Повреждение эндотелия является важным компонентом патогенеза сердечно-сосудистых заболеваний, в частности, ишемической болезни сердца (ИБС), артериальной гипертензии (АГ). Высокоспецифическим маркёром повреждения эндотелия является число циркулирующих в крови (десквамированных) эндотелиоцитов (ЦЭК).

Целью настоящих методических рекомендаций является ознакомление врачей-лаборантов, терапевтов, кардиологов и врачей смежных специальностей с методами оценки ЦЭК, их клиническим и прогностическим значением у больных сердечно-сосудистыми заболеваниями.

Представленные материалы включают как обобщение литературных данных, так и результаты анализа собственных данных, полученных в процессе обследования и лечения больных артериальной гипертензией (АГ).

1. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЭНДОТЕЛИЯ

1.1. Морфология эндотелия

В организме взрослого человека содержится $1-6 \times 10^{13}$ эндотелиальных клеток суммарной массой около 1 кг, покрывающих площадь $1-7 \text{ м}^2$ [Augustin H.G., 1994]. Для эндотелия, как и для типичных эпителиев, характерны пограничное положение, отсутствие межклеточного вещества, наличие сходной по строению базальной мембраны (содержит коллаген IV типа и ламинин-альфа 4), наличие системы межклеточных контактов, формирующих непрерывный клеточный пласт, общность механизмов роста в культуре и при репаративной регенерации. Эндотелий представляет однослойный пласт, образованный полигональными уплощенными клетками длиной 20-150 и шириной 10-20 мкм (рис. 1). Это, как правило, одноядерные диплоидные клетки толщиной 3-5 мкм в области ядра и 0,1-0,4 мкм на периферии. Число взаимных контактов между эндотелиоцитами (степень связности) варьирует от 3 до 12.

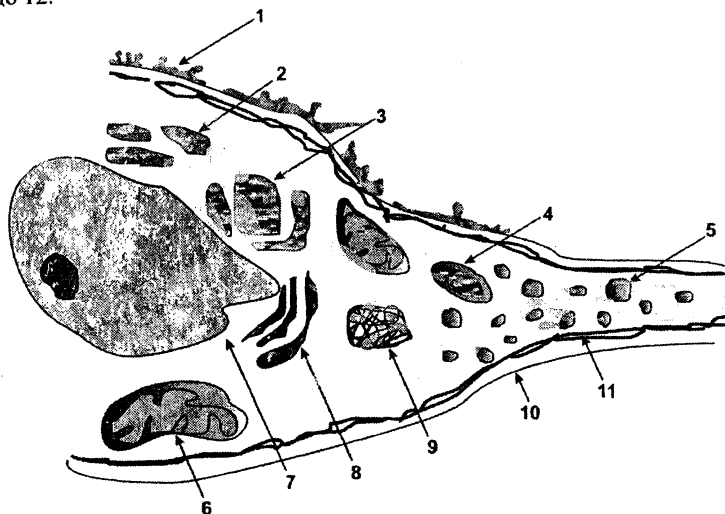


Рис. 1. Строение эндотелиоцита (схема). 1 – гликокаликс, 2 – пластинчатый комплекс, 3 – клеточный центр, 4 – лизосома, 5 – микропиноцитозные везикулы, 6 – митохондрия, 7 – ядро, 8 – гранулярная эндоплазматическая сеть, 9 – тельце Вейбеля-Паладе, 10 – базальная мембрана, 11 – элементы цитоскелета.

Ядро находится в центральной зоне клетки и содержит, как правило, одно ядрышко. Форма ядер овальная или лопастная, с многочисленными инвагинациями кариолеммы. Наиболее характерной структурой эндотелиоцитов являются микропиноцитозные везикулы, занимающие до 30-40% объема цитоплазмы. Микропиноцитозные везикулы обеспечивают транспорт веществ, рецепторно связывающихся с поверхностью эндотелиоцитов, а также анионных белков. Латеральные поверхности эндотелиоцитов содержат специализированные межклеточные контакты, которые являются интегрирующими структурами монослоя эндотелиоцитов в ткань, обеспечивают устойчивость пласта по отношению к потоку крови или лимфы и возможность транспорта веществ. Эндотелий лежит на базальной мембране, которая является непрерывным слоем электронноплотного фибриллярного материала толщиной 30-300 нм, имеет сетевидную структуру, образована коллагеном (преимущественно IV типа), гликопротеинами (фибронектин и ламинин), гепарин-сульфатосодержащими протеогликанами. Базальная мембрана определяет форму, взаимное расположение эндотелиоцитов. Помимо базальной мембраны эндотелиоциты контактируют с перичитами, гладкими миоцитами.

В различных участках сосудистой системы эндотелиоциты находятся в неодинаковых условиях гемодинамики и метаболизма, вследствие чего они отличаются по ориентации относительно оси сосуда, форме, размерам, свойствам ядра и цитоплазмы и т.д. (полиморфизм эндотелия). Исходя из фенотипических различий эндотелиоцитов различных отделов сосудистой системы, выделяют следующие специализированные формы эндотелия:

1. эндотелиоциты соматического типа локализованы в микроциркуляторном русле желез внешней секреции, органов центральной нервной системы, сердца, легких, тимуса, селезенки, а также в магистральных сосудах;

2. эндотелий фенестрированного (перфорированного, пористого, висцерального) типа выстилает капилляры клубочков почек, эндокринных желез, слизистой оболочки пищеварительного тракта, сосудистых сплетений мозга;

3. синусоидный (большой пористый, крупноокошечный, печеночный) тип эндотелия типичен для сосудов костного мозга (обеспечивает миграцию форменных элементов крови), печени и коры надпочечников;

4. решетчатый (межклеточный щелевой, синусный) тип эндотелия характерен для венозных синусов красной пульпы селезенки;

5. высокий эндотелий посткапиллярных венул (ретикулярного, звездчатого типа) специфичен для лимфоидных органов;

6. эндотелий лимфатического русла.

1.2. Функции эндотелия

Эндотелий разделяет внутри- и внесосудистое пространство, представляя избирательно проницаемый барьер. Пограничное положение эндотелия между кровью и тканями обуславливает выполнение следующих жизненно важных задач (рис. 2):



Рис. 2. Основные функции эндотелия.

Примечания: ГАГ – гликозаминогликаны; ТАП – тканевой активатор плазминогена; VEGF – сосудистый эндотелиальный фактор роста; bFGF – основной фактор роста фибробластов; PDGF – фактор роста тромбоцитов; IGF-1 – инсулиноподобный фактор роста; TGF β – трансформирующий фактор роста; ИЛ-1 – интерлейкин-1.

2. ПРОИСХОЖДЕНИЕ ЦЭК

Фиксация эндотелиоцитов к базальной мембране осуществляется с помощью витронектина, фибронектина, кадгерinov и более эффективна у молодых клеток. Процесс десквамации отражает обновление эндотелия, утратившего способность выполнять присущие ему функции вследствие старения или воздействия повреждающих факторов. В основе десквамации

эндотелия лежат активация протеиназ, некроз и/или апоптоз эндотелиоцитов (рис. 3).

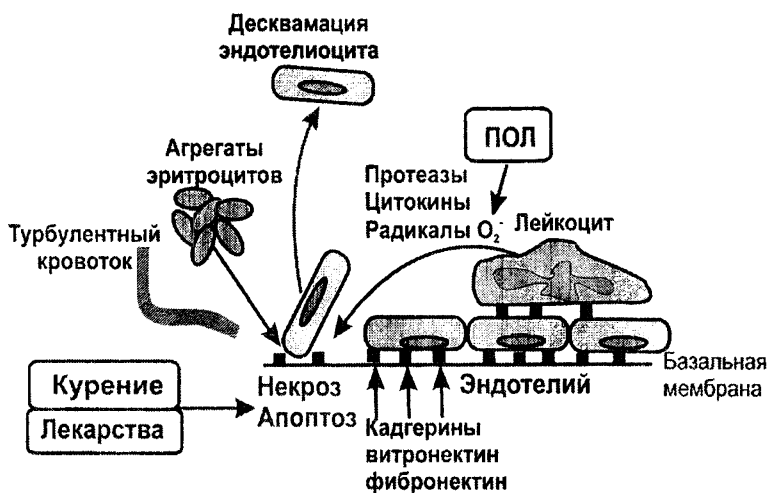


Рис. 3. Схема десквамации эндотелия.

Примечание: ПОЛ – перекисное окисление липидов.

При повреждении и апоптозе происходит нарушение функционирования протеинов, обеспечивающих соединение эндотелиоцитов с базальной мембраной, что приводит к десквамации эндотелиоцита. Продолжительность нахождения ЦЭК в крови составляет около 24-42 часов, в течение которых происходит их захват и разрушение макрофагами печени, лёгких и селезёнки.

Апоптозу и некрозу эндотелиоцитов, повышению продукции протеиназ, разрывающих соединение эндотелиоцитов с подлежащей интимой, способствуют провоспалительные цитокины, свободные радикалы и активные формы кислорода. Источником этих биологически активных веществ могут быть лейкоциты, особенно адгезированные на эндотелии. Эндотелий характеризуется высокой стабильностью, что подтверждается редким обнаружением апоптотических эндотелиоцитов в интиме сосудов в норме.

В таблице 1 приведены некоторые факторы, влияющие на число ЦЭК.

Таблица 1

Факторы, влияющие на число ЦЭК

Факторы, увеличивающие число ЦЭК	Факторы, уменьшающие число ЦЭК
Холестерин	Клофибрат
Гомоцистеин	Гепарин
Катехоламины (адреналин, норадреналин, изопреналин)	Простаглицин
Хлорид кальция, высокие дозы	Хлорид кальция, низкие дозы
АДФ	Ингибирование АПФ
Лактат	Ацетилсалициловая кислота, низкие дозы
Протамина	Антагонисты кальциевых каналов
Эндотоксин	Дигоксин

Исследованиям происхождения и источника ЦЭК посвящен ряд исследований [Dignat-George F., 2000; Makin A., 2004]. На ЦЭК обнаруживаются специфические для эндотелиоцитов маркёры, такие как P1H12, тромбомодулин, flk-1, сосудистый эндотелиальный кадгерин, а также фактор фон Виллебранда, PECAM-1, CD34, CD36 и интегрин α_v . Flk-1 и CD34 также являются маркёрами гемангиобластов и гемопоэтических клеток-предшественников. Большинство обнаруживаемых ЦЭК имеют микрососудистое происхождение вследствие наличия маркёров CD 36. Однако при разрыве атеросклеротической бляшки и развитии ИМ в крови найдены ЦЭК преимущественно макрососудистого происхождения, которые не находились в состоянии апоптоза.

Кроме дифференцированных клеток, популяция ЦЭК включает гемопоэтические эндотелиальные клетки-предшественники (ЦЭК-п) костномозгового происхождения, схожие по фенотипу с эмбриональными ангиобластами. ЦЭК-п также экспрессируют маркёры эндотелиоцитов, но экспрессия маркёров активации эндотелия (ICAM-1, VCAM-1 и тканевой тромбопластин) увеличивается только после стимуляции ИЛ-1 или липополисахаридом. Таким образом, выявление и дифференцировка ЦЭК-п от зрелых ЦЭК и гемопоэтических клеток в периферической крови затрудняется отсутствием у первых специфических маркеров. Одним из возможных селективных маркеров может быть AC 133, который экспрессируется на стволовых гемопоэтических клетках и ЦЭК-п и не обнаруживается на зрелых эндотелиоцитах.

ЦЭК-п имеют большую способность к селективной адгезии, способны локально мигрировать к месту повреждения эндотелия, в зоны ишемии, пролиферировать, дифференцироваться в зрелые эндотелиоциты и, таким образом, участвовать в репарации эндотелия и формировании атромбогенной неонинтмы (ангиогенез *in vivo*). Зрелые ЦЭК имеют низкую пролиферативную способность и не участвуют в неоваскуляризации.

В настоящее время интенсивно изучается роль ЦЭК-п в постнатальном ангиогенезе (неоваскуляризация зон ишемии, участие в опухолевом росте и метастазировании). Вероятные кандидаты на роль сигналов, приводящих к высвобождению ЦЭК из костного мозга, включают трансформирующий фактор роста- α , основной фактор роста фибробластов и сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF). У больных ИБС отмечается снижение числа ЦЭК-п и нарушение их способности к миграции, которые коррелируют с факторами риска (возраст, пол, курение, уровень липопротеинов низкой плотности, наличие АГ, сахарного диабета), что может нарушать неоваскуляризацию зон ишемии.

3. МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЦЭК

3.1. Исторические аспекты определения ЦЭК

Циркулирующие в крови негематологические клетки были впервые обнаружены в 1934 г. у онкологических больных [Pool E.H., 1934]. В последующем, на основании исследований морфологии установлено эндотелиальное происхождение интактных, содержащих ядра клеток, выделенных из лейкоконцентрата Bouvier S.A. и соавт. (1970) и безъядерных клеточных «каркасов», выделенных из богатой тромбоцитами плазмы Hladovec J. и соавт. (1973). Сравнительно недавно методом проточной цитометрии с помощью моноклональных антител доказано, что эти клетки являются эндотелиоцитами [George F., 1991].

Определение ЦЭК можно проводить с помощью методов иммунофлюоресцентного, иммуноцитохимического анализа, проточной цитометрии, иммуномагнитной изоляции. Каждый из них имеет свои преимущества и недостатки. Для идентификации эндотелиоцитов наиболее часто используют антитела к наиболее специфическим для эндотелиоцитов поверхностным маркерам:

- фактору фон Виллебранда, который синтезируется и затем экспрессируется на клеточной поверхности эндотелиоцитов. Этот фактор не

является строго специфичным для эндотелиоцитов, так как также синтезируется тромбоцитами;

- рецепторам для сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF). VEGF является цитокином, участвующим в ангиогенезе. На эндотелии экспрессируется 2 типа рецепторов к VEGF: VEGF-R1 (также экспрессируется на моноцитах) и VEGF-R2 (также экспрессируется на клетках панкреатических протоков, тестикул). Антитела к VEGF-R2 являются высокоспецифическими маркерами ЦЭК, так как VEGF-R2 отсутствует на других циркулирующих клетках крови.

- эндотелиальному антигену CD146, который принадлежит к суперсемейству иммуноглобулинов и широко представлен на всех типах эндотелиальных клеток, но не определяется на гематопоэтических клетках.

На настоящее время наиболее совершенным методом выявления ЦЭК является иммуномагнитная изоляция [Dignat-George F., 2000]. Эндотелиоциты выделяются из крови посредством намагнитченных частиц, покрытых антителами к факторам, экспрессируемым на эндотелии. Альтернативным методом является флоуцитометрия эндотелиоцитов, связанных с мечеными моноклональными антителами, предложенная Mancuso P. и соавт.

3.2. Метод иммуномагнитной изоляции ЦЭК

(по George F., 1992; Bardin N., 1996; Bardin N., 1996)

Принцип метода

S-Endo1 моноклональные антитела против эндотелиального антигена CD 146 являются высоко селективными для эндотелиоцитов всех сосудистых бассейнов, при этом они не реагируют с гемопоэтическими клетками, мезотелиоцитами, фибробластами. Дальнейшая иммунологическая идентификация ЦЭК может быть проведена с помощью антител к фактору фон Виллебранда, молекул адгезии ICAM-1, VCAM-1, Е-селектина, антител, меченных флюоресцин-изотиоцианатом, к тканевому тромбопластину и CD36.

Ход определения

1 мл цельной крови, разведённой в соотношении 1:4 раствором, состоящим из фосфатного буфера, 0,1% альбумина, 0,1% азида натрия, смешивается с 20 мкл намагнитченных полистереновых шариков диаметром 4,5 нм, покрытых S-Endo1 моноклональными антителами, и встряхивается в течение 30 минут. Намагнитченные шарики и клеточные розетки сепарируются из крови с помощью специального концентратора. После двойного отмывания клеточные розетки ресуспендируют в растворе акридинового оранжевого (10 мг/мл). Анализ и подсчёт клеток проводится с

помощью оптического флюоресцентного микроскопа ($\lambda=490$ нм) и гемоцитометра. Для иммунологической идентификации клеточные розетки регидратируют в фосфатном буфере, фиксируют в 3% параформальдегиде, добавляют Тритон X 100 и инкубируют с антителами к фактору фон Виллебранда вместе с антителами к молекулам адгезии ICAM-1, VCAM-1, Е-селектину, тканевому тромбопластину и CD36 в течение 3-х часов. После отмывания проводят инкубацию клеточных розеток с мечеными флюоресцином факторами к вышеуказанным антителам, повторно отмывают и готовые образцы анализируют с помощью конфокального микроскопа.

3.3. Изоляция ЦЭК

(по Solovey A., 1997)

Свежая венозная кровь стабилизируется ЭДТА. Для получения бедной тромбоцитами плазмы проводится центрифугирование при 13000 g в течение 12 мин. До проведения анализа плазма хранится при -20° C. Кровь фиксируется 0,2% параформальдегидом в течение 10 мин и отмывается фосфатным буфером, после чего разбавляется в 4 раза фосфатным буфером вместе с 0,5% раствором альбумина и 1 М ЭДТА. Иммуномагнитные шарики (Dynal, Oslo, Norway), покрытые антиэндотелиальными моноклональными антителами к P1H12, инкубируются в течение 1 часа с суспензией ЦЭК. Приготовленные препараты дополнительно фиксируются 4% параформальдегидом.

3.4. Иммунофлюоресцентный метод оценки ЦЭК

(по Mahdy Z., 1998)

Принцип метода

Основан на различии в седиментационных свойствах клеток в градиенте плотности, создаваемой суспензией Percoll (Sigma Ltd., Poole, UK).

Для приготовления базовой суспензии Percoll смешивается 93 мл Percoll (плотность 1,130 г/мл) с 7 мл раствора $\text{NaCl}/\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (1,54 М NaCl вместе с 1 М раствором $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ в деионизированной воде). При смешивании 46 мл базовой суспензии Percoll, 10 мл человеческого альбумина (5 мг/мл) (Sigma), 34 мл модифицированного по Дильбекко фосфатного буфера и 10 мл 3,8% раствора цитрата натрия получают 100 мл суспензии Percoll (плотность 1,060 г/мл). Приготовление проводится в асептических условиях и все растворы (кроме Percoll) фильтруются через Flowpore (размер пор 22 нм).

Ход определения

Для изоляции ЦЭК кровь, стабилизированная цитратом натрия, смешивается с равным объёмом суспензии Percoll (плотность 1,060 г/мл) и центрифугируется в течение 10 мин при комнатной температуре (1000 g). Отбирается верхний клеточный слой и центрифугируется в течение 10 мин при 400 g для сгущения клеток. Эти клетки забираются в отдельную пробирку и ресуспендируются. Для идентификации и подсчёта числа ЦЭК используются иммуноцитохимические методы. 100 мкл клеточной суспензии используют для приготовления мазка, который инкубируют с антителами (в разведении 1:200) в течение 30 мин при 37⁰ С. После отмывания фосфатным буфером проводится инкубация со вторичными антителами к антителам (к фактору фон Виллебранда и рецептору для VEGF), меченными флюорохромом (флюоресцеин изотиоцианат) в течение 30 мин при 37⁰ С. Полученные мазки просматриваются с помощью флюоресцентного микроскопа (длина волны возбуждения 490 нм, эмиссии – 520 нм). Клетки дифференцируются от скоплений клеточных фрагментов с помощью фазово-контрастной микроскопии на основании оценки их размеров и морфологии.

3.5. Метод морфологической идентификации ЦЭК

(по Hladovec J., 1978; Петрищев Н.Н., 2001 с модификацией авторов)

Принцип метода

Метод основан на изоляции десквамированных эндотелиоцитов вместе с тромбоцитами с последующим осаждением тромбоцитов аденозиндифосфатом. Выделенные эндотелиоциты подсчитываются в счётной камере с помощью фазово-контрастного микроскопа. В нашей модификации осаждение тромбоцитов проводили адреналином, подсчёт ЦЭК осуществляли с помощью светового микроскопа после предварительной окраски клеток красителем.

Реактивы

1. Цитрат натрия, 3,8% раствор (растворяют 3,8 г цитрата натрия в 100 мл дистиллированной воды. Хранят в холодильнике не более 1 недели).
2. Этиловый спирт или другой антисептик для обработки кожных покровов.
3. Натриевая соль аденозиндифосфата (1 мг/мл) или адреналин, 0,1% раствор.
4. Красители: метиленовый синий, 0,1% раствор; реактив Самсона (для приготовления раствора Самсона смешивают 5 мл 10% уксусной кислоты с 0,1 г метиленового фиолетового).

Оборудование

1. Стерильные шприцы.

2. Пластиковые пробирки (мерные центрифужные, а также немерные и нецентрифужные). Для взятия крови удобнее использовать пластиковые пробирки вместимостью 10 мл, а для работы с плазмой – пластиковые пробирки вместимостью 3 мл.

3. Автоматические пипетки со съёмными пластиковыми наконечниками на 100–1000 мкл.

4. Центрифуга.

5. Световой микроскоп.

6. Счётная камера Горяева.

Материал для исследования

Забор крови производится утром натощак путём пункции локтевой вены. Травма сосудистой стенки при венепункции сопровождается повышением числа ЦЭК в образце крови. Для уменьшения попадания эндотелия из пунктированной сосудистой стенки целесообразно использовать периферический венозный катетер или удалять первые 2-5 мл крови. В пластиковую пробирку берётся 5 мл крови, которую стабилизируют 3,8% раствором цитрата натрия в соотношении 9:1. Для приготовления плазмы, содержащей ЦЭК, сразу после взятия кровь центрифугируют 5 мин при 1500 об/мин. 1 мл полученной плазмы смешивают с 0,2 мл натриевой соли аденозиндифосфата [Петришев Н.Н., 2001]. В нашей модификации 2 мл полученной плазмы смешивают с 0,1 мл 0,1% раствора адреналина. Для удаления агрегатов тромбоцитов полученную смесь механически перемешивают 10 мин путём аккуратного встряхивания пробирок и центрифугируют 10 мин при 1000 об/мин. Аккуратно переносят 1,6 мл супернатанта, свободного от тромбоцитов, в другую пробирку. Для концентрирования эндотелиоцитов супернатант центрифугируют 15 мин при 1000 об/мин. Удаляют надосадочную жидкость, получая 0,1 мл концентрированной (в 16 раз) суспензии ЦЭК. Для лучшей визуализации ЦЭК проводят их окрашивание. Для этого полученную суспензию ЦЭК в объёме 0,1 мл переносят в другую пробирку, куда при перемешивании стеклянной палочкой добавляется метиленовый синий (1 капля 0,1% раствора) или аналогичное количество реактива Самсона.

Ход определения

Готовой суспензией наполняют камеру Горяева, проводят микроскопию под увеличением 400. Подсчёт ЦЭК производят во всех квадратах камеры Горяева (225 больших квадратов). Расчёт числа ЦЭК в 100 мкл крови производят, исходя из сгущения суспензии (16), числа подсчитанных квадратов (225) и объёма 1 большого квадрата ($4 \cdot 10^{-3}$ мкл) по формуле (1):

$$X = (A \times 100) / (225 \times 4 \times 10^{-3} \times 16), \quad (1)$$

где: X – число ЦЭК в 100 мкл крови, А – число подсчитанных ЦЭК.

В результате сокращения $X=A \times 6,94$

Для повышения точности метода необходимо проводить подсчёт ЦЭК в нескольких сетках камеры Горяева и за итоговый показатель принимать среднее арифметическое полученных показателей.

Число ЦЭК в составе скоплений рассчитывают по формуле (2):

$$Y=(B \times 100)/A, \quad (2)$$

где: Y – процентное содержание числа ЦЭК в составе скоплений, В – число ЦЭК в составе скоплений, А – общее число сосчитанных ЦЭК.

3.6. Приготовление мазков ЦЭК

Для изучения морфологии ЦЭК целесообразно приготовление мазков. Для этого получают концентрированную суспензию эндотелиоцитов способом, описанным выше. На сухое предметное стекло наносят каплю суспензии и размазывают с помощью чистого шлифованного стекла, помещая его под углом 45° . Мазки высушивают на воздухе. Высохший мазок должен быть равномерно тонким, желтоватого цвета. Мазки фиксируют и окрашивают по Паппенгейму.

Реактивы

1. Раствор эозин-метиленового синего по Май-Грюнвальду (для его приготовления растворяют 1 г красителя в 1000 мл метилового спирта);

2. Рабочий раствор азур-эозина по Нохту (25 мл основного раствора азур-эозина II смешивают с 20 мл основного раствора эозина калия и 55 мл фосфатного буфера, pH 7,4).

Оборудование

Эмалированный лоток с установленными для стёкол «рельсами» из пары стеклянных палочек.

Окраска по Паппенгейму

Сухие нефиксированные мазки фиксируют раствором Май-Грюнвальда 3 мин, наливая на мазок, помещённый на «рельсы», высоким слоем. На мазок, не сливая краситель, добавляют дистиллированную воду на 1 мин. Смывают краску водопроводной водой, высушивают на воздухе. Докрашивают мазок рабочим раствором азур-эозина по Нохту в течение 15 мин. Повторно смывают краску водопроводной водой, высушивают на воздухе.

3.7. Гистохимические методы исследования ЦЭК

Установлено, что в эндотелии мелких артерий и капилляров в отличие от аорты и крупных артерий мышечно-эластического типа имеет место высокая активность щелочной фосфатазы [Агеев А.К., 1969]. Выявление щелочной фосфатазы целесообразно проводить по методу [Gomori G., 1946]. Для этого взвесь эндотелиоцитов обрабатывают инкубационным раствором (глицерофосфат натрия 0,5 г, медиал 0,5 г, 2% хлорид кальция 5 мл, 2 % сульфат магния 5 мл, дист. вода до 100 мл). Последовательно добавляют 2 % сульфат (нитрат) кобальта, 1 % сульфид аммония. После каждого добавления реагентов осуществляют промывания водой. Докрашивают слабым азуром 2.

3.8. Оценка апоптотических и жизнеспособных ЦЭК

Для выявления разрывов цепочек ДНК применяется метод TUNEL (TdT-mediated dUTP nick end labeling) [Gavrieli X., 1992], однако эта технология не выявляет ранние стадии апоптоза. В ранней фазе апоптоза клеточная мембрана сохраняет свою барьерную функцию, в то время как повышенная проницаемость мембраны является признаком некроза или поздней фазы апоптоза. Для оценки жизнеспособности нефиксированные препараты ЦЭК инкубируют в течение 10 мин с красителем (Sytox в TRIS буфере, 10 мг/мл), который проникает через мембраны мёртвых клеток. После отмывания ЦЭК фиксируют и оценивают методом TUNEL. Цветовая комбинация позволяет установить число мёртвых и живых клеток.

Для определения апоптоз-индуцированных цитоплазматических фрагментов ДНК, связанных с гистонами (моноклеосом и олигонуклеосом) может быть успешно использован метод ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay). Метод использует специальные антитела к гистонам и ДНК-компонентам нуклеосом в цитоплазматической фракции клеточного лизата.

Конденсацию хроматина и разрывы эндоплазматического ретикулума при апоптозе позволяет визуализировать акридиновый оранжевый [Lucas R., 1998].

4. МОРФОЛОГИЯ ЦЭК

После фиксации и окраски в мазках эндотелиоциты представляли собой достаточно крупные (20-40 мкм) клетки. Форма ЦЭК отличалась полиморфизмом: они могли быть округлыми, овальными, полигональными. Наиболее часто обнаруживались полигональные ЦЭК. Эта форма клетки была исходной, все остальные формы являлись производными при распластывании клетки. Ядерно-цитоплазматическое отношение характеризовалось наличием довольно крупного ядра по отношению к общей величине клетки. Крупное

ядро располагалось чаще в центральной части клетки, но встречалось и эксцентричное расположение ядра. При использовании в качестве красителя метиленового синего наблюдалось голубое окрашивание цитоплазмы, более интенсивно окрашивалось эксцентрично расположенное крупное ядро. Следует отметить, что эндотелиальные клетки имеют различную выраженность морфологических повреждений. «Жизнеспособные» эндотелиоциты, относительно недавно поступившие в кровоток, характеризовались наличием целого ядра и более бледной окраской по сравнению с клетками эндотелия, подвергшегося апоптозу (каркасы эндотелиоцитов) (фото 1).

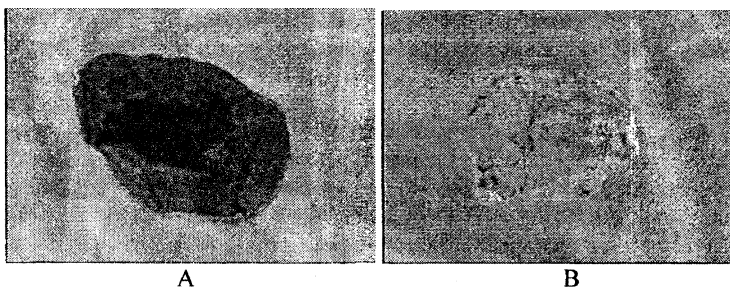


Фото. 1. Каркас эндотелиоцита (А) и «жизнеспособный» (В) эндотелиоцит. Окраска метиленовым синим. Ув. 750.

Также в крови обнаруживали скопления десквамированных эндотелиоцитов, состоящие из нескольких (чаще из 2-3) клеток (фото 2).

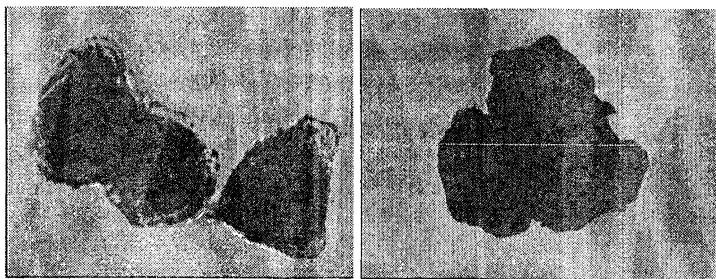


Фото. 2. Скопления десквамированных эндотелиоцитов. Окраска метиленовым синим. Ув. 750.

Число эндотелиоцитов, подвергшихся апоптозу, увеличивается при воздействии различных стимулов (интерлейкин-1, фактор некроза опухоли α , окисленные липопротеины низкой плотности) [Stefanec T., 2000; Bombeli T., 1997].

Реактив Самсона окрашивал ядра и цитоплазму эндотелиоцитов в красноватый цвет (фото 3А). В крови наряду с ЦЭК обнаруживались также «обломки» эндотелия в виде мелких (до 10 мкм) интенсивно окрашенных фрагментов клеточных мембран (фото 3В).

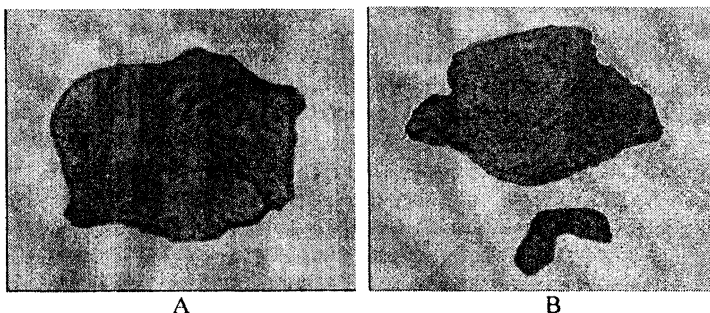


Фото. 3. Десквамированный эндотелиоцит (А), эндотелиоцит и лежащий рядом фрагмент эндотелия (В). Окраска реактивом Самсона. Ув. 750.

Морфологических различий каркасов и жизнеспособных ЦЭК, выделенных у здоровых людей и у больных АГ, не было обнаружено.

5. КЛИНИЧЕСКОЕ И ПРОГНОСТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ ЦЭК У БОЛЬНЫХ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫМИ ЗАБОЛЕВАНИЯМИ

5.1. Число ЦЭК у здоровых и больных сердечно-сосудистыми заболеваниями

Увеличение в крови числа ЦЭК описано при различных патологических состояниях, вовлекающих эндотелий: атеросклероз, инфаркт миокарда (ИМ), артериальная гипертензия (АГ). Так, повышение числа ЦЭК в крови является прямым доказательством повреждения эндотелия покрышки атеросклеротической бляшки, которое может привести к острому инфаркту миокарда либо к нестабильной стенокардии. У больных метаболическим

сердечно-сосудистым синдромом количество ЦЭК тесно коррелируют с повышенным уровнем инсулина и атерогенных фракций липопротеинов.

В связи с тем, что увеличенное число ЦЭК является маркером активности заболеваний, протекающих с повреждением эндотелия, представляет интерес изучение процесса десквамации эндотелия у больных АГ как одной из наиболее распространённых форм сердечно-сосудистой патологии. У больных с повышенным АД и острым ишемическим инсультом обнаружено достоверно большее число ЦЭК ($p < 0,001$), содержание фактора фон Виллебранда в плазме ($p = 0,008$), растворимого Е-селектина ($p = 0,002$) по сравнению с больными АГ без инсульта и здоровыми. Наличие острого ишемического инсульта ассоциировано с увеличенным числом ЦЭК. Число ЦЭК коррелировало с уровнем фактора фон Виллебранда ($r = 0,35$; $p = 0,001$), растворимого Е-селектина ($r = 0,43$; $p < 0,001$), являющимися плазменными маркерами эндотелиального повреждения/дисфункции [Nadar S.K., 2005].

Исследовали содержание ЦЭК у 30 здоровых и 220 больных АГ II степени по методу [Hladovec J., 1978]. В крови у здоровых обнаруживали 59 ± 17 ЦЭК/100 мкл, из них жизнеспособные ЦЭК составляли 42,7%. Число ЦЭК в составе скоплений было $4,4 \pm 0,6\%$.

Распределение ЦЭК и их скоплений у здоровых людей в зависимости от возраста представлено в таблице 2. Отличия между возрастными группами по числу ЦЭК и их скоплений были недостоверными ($p > 0,05$).

Таблица 2

Число ЦЭК и содержание ЦЭК в составе скоплений у здоровых людей в различных возрастных группах

Возраст	Число людей	Число ЦЭК/100 мкл	Число ЦЭК в составе скоплений, %
40-50	10	64 ± 6	$3,3 \pm 0,9$
50-60	11	56 ± 5	$5,5 \pm 0,9$
60-70	9	58 ± 6	$4,2 \pm 1,1$

В группе больных АГ II степени ($n = 220$) при гипертоническом кризе обнаруживали 139 ± 3 ЦЭК/100 мкл, из них жизнеспособные ЦЭК составляли 28,7%. Число ЦЭК в составе скоплений было $8,3 \pm 0,3\%$. В конце стационарного лечения отмечалось достоверное снижение числа ЦЭК до 110 ± 3 клеток/100 мкл., числа ЦЭК в составе скоплений до $6,5 \pm 0,3\%$. ($p < 0,05$). Распределение ЦЭК и их скоплений у больных АГ II степени в различных возрастных группах показано в таблице 3.

Таблица 3

Число ЦЭК и содержание ЦЭК в составе скоплений у больных АГ II степени в различных возрастных группах

Возраст	N	Число ЦЭК/100 мкл		Число ЦЭК в составе скоплений, %	
		1	2	1	2
<40	4	106±11	81±9	11,1±3	4,2±1,4
40-50	39	117±7	94±6	8,8±0,7	6,6±0,7
50-60	93	141±5	110±5	8±0,4	6,2±0,5
60-70	84	146±6	118±6	7,7±0,5	6,3±0,5

Примечание: 1 –при кризе, 2 – показатель в конце стац. лечения.

При гипотензивной терапии снижение содержания каркасов ЦЭК (до 70,6%) и повышение уровня жизнеспособных ЦЭК (до 29,4%) было недостоверным ($p>0,05$).

Число ЦЭК и их содержание в составе скоплений у больных АГ достоверно превышали показатели, полученные у здоровых людей ($p<0,01$).

5.2. Изменение числа ЦЭК под влиянием медикаментозного лечения

Содержание ЦЭК изменяется при применении различных препаратов, в частности, используемых в лечении сердечно-сосудистых заболеваний. Аспирин уменьшает десквамацию эндотелия и число ЦЭК. Аспирин обладает антиапоптотическим действием и уменьшает активность ядерного фактора NF- κ B, экспрессию молекул адгезии и адгезию лейкоцитов. Гепарин также уменьшает апоптоз эндотелиоцитов и число ЦЭК через активацию NO-синтазы, которая имеет антиапоптотический эффект. Терапия статинами сопровождается улучшением функционального состояния эндотелия и снижением числа ЦЭК, вероятно, за счёт снижения уровней провоспалительных цитокинов, снижения количества макрофагов и секреции ими металлопротеиназ (плейотропное действие статинов). Наряду с этим, статины увеличивают число ЦЭК-п. Ингибиторы АПФ прямо, а β -адреноблокаторы опосредованно, через уменьшение продукции ренина, снижают образование ангиотензина II – одного из индукторов апоптоза в эндотелиоцитах. Применение β -адреноблокаторов уменьшает влияние эндогенных катехоламинов, которые увеличивают число ЦЭК. Антагонисты кальция также оказывают антиапоптотическое действие.

Нами получены достоверные отличия в содержании ЦЭК и их скоплений при применении некоторых гипотензивных препаратов (табл. 4).

Таблица 4

Динамика числа ЦЭК и скоплений ЦЭК у больных АГ II степени при приеме некоторых гипотензивных препаратов

Группы обследованных больных, получавших:	Число ЦЭК на 100 мкл		Число ЦЭК в составе скоплений, %	
	До лечения	После лечения	До лечения	После лечения
амлодипин (n=50)	138±8	110±7*	8,3±0,65	6,4±0,7*
эналаприл (n=50)	140±7	105±7*	8,6±0,64	6,4±0,6*
атенолол (n=50)	137±7	112±7*	8,3±0,6	7±0,6*
лизиноприл (n=35)	141±7	103±6*	8,1±0,7	6,1±0,7*
каптоприл (n=35)	141±8	121±8*	7,8±0,7	6,7±0,7*

Примечание: * – достоверность различий в показателях до и после лечения ($p<0,05$).

В наибольшей степени число ЦЭК снизилось при лечении ингибиторами АПФ лизиноприлом (на 26,9%) и эналаприлом (на 25%). Конечное число ЦЭК после лечения каптоприлом достоверно превышало показатели, полученные в группе, принимавшей эналаприл ($p<0,05$). По степени снижения ЦЭК достоверные отличия обнаружены между группами, принимавшими лизиноприл и атенолол, лизиноприл и каптоприл ($p<0,05$). Число ЦЭК уменьшалось у 41 (82%), 28 (80%), 37 (74%) больных АГ, получавших соответственно эналаприл, лизиноприл и амлодипин.

5.3. Число ЦЭК как прогностический фактор неблагоприятных исходов у больных сердечно-сосудистыми заболеваниями

В настоящее время активно определяется значение плазменных маркеров повреждения эндотелия в прогнозировании неблагоприятных кардиоваскулярных событий. Установлено, что заболевания, сопровождающиеся повреждением эндотелия, ассоциируются с повышением летальности больных [Stefanec T., 2000].

Показано, что повышенные уровни маркеров воспаления (интерлейкин-6), эндотелиальной активации, дисфункции (фактор фон Виллебранда) и повреждения эндотелия (ЦЭК) являлись предикторами неблагоприятных исходов острого коронарного синдрома (ОКС) [Libby P., 2002]. Уровень ЦЭК, фактора фон Виллебранда и ИЛ-6 у больных с ОКС были выше, чем у

больных со стабильной стабильной стенокардией напряжения и у здоровых. Число ЦЭК также было достоверно больше у больных ИМ по сравнению со здоровыми людьми и больными стабильной стенокардией напряжения. Это может быть связано с разрывом атеросклеротической бляшки [Mutin M., 1999]. Большее число ЦЭК у пациентов с развившимся повреждением миокарда (ИМ) в сравнении с больными без повреждения (нестабильная стенокардия) отражает более существенное повреждение эндотелия.

В другом исследовании установлено увеличенное число ЦЭК и содержание биохимического маркера воспаления С-реактивного протеина у больных ИМ по сравнению со здоровыми. Эти показатели коррелировали между собой ($r=0,5$; $p=0,001$). Частота апоптоза и некроза ЦЭК составляла соответственно 25% и 19%. Число ЦЭК не коррелировало с возрастом, полом, уровнем холестерина, наличием ожирения, АГ, курением, наличием отягощённого по сердечно-сосудистой патологии анамнеза [Wang C., 2005]. Таким образом, повышение уровня ЦЭК свидетельствует об эндотелиальном повреждении вследствие разрыва или эрозии атеросклеротической бляшки [Davies M.J., 2001]. При этом ключевую роль играет воспаление. Yang L.X. и соавт. у пациентов с ИБС обнаружили значимую корреляцию числа ЦЭК и уровня малонового диальдегида ($r=0,8$) в зависимости от тяжести заболевания и проведения терапии. Полученные данные свидетельствует о возможности повреждения сосудистого эндотелия липидными пероксидами. Выявленное соотношение показателей позволяет судить о тяжести и прогнозе ИБС [Yang L.X., 1993].

У больных с застойной сердечной недостаточностью Chong A.Y. и соавт. получили данные об обратной зависимости между эндотелий-зависимой вазодилатацией и числом ЦЭК ($p=0,002$), а также положительной – между ЦЭК и фактором фон Виллебранда ($p=0,032$) [Chong A.Y., 2004].

В исследовании Quilici J. и соавт. показано, что число ЦЭК наряду с тропонином I является важным диагностическим маркером ОКС без подъёма ST [Quilici J., 2004]. Количество ЦЭК измерялось сразу при госпитализации, через 4 и 8 часов у больных с подтверждённым ОКС без подъёма ST. Интервал между появлением боли за грудиной и подъемом уровня ЦЭК был значимо короче, чем для тропонина I. Повышенное число ЦЭК у пациентов с нормальным уровнем тропонина I позволяло установить диагноз в 30% случаев, не выявленных с помощью тропонина I. Чувствительность определения ЦЭК для диагностики ОКС была несколько ниже, чем при определении тропонина I (соответственно 53,3% и 61,7%). Специфичность обоих маркеров составляла 100%. Комбинированное использование ЦЭК и тропонина I сопровождалось улучшением диагностики ОКС без подъёма ST в первые часы от момента госпитализации. Снижение чувствительности

определения числа ЦЭК может быть связано с их элиминацией из кровотока. Наибольшее число ЦЭК обнаруживалось при поступлении больных с ОКС в стационар и в дальнейшем снижалось.

Таким образом, в остром и острейшем периоде развития коронарной патологии повышается уровень ЦЭК за счет десквамации эндотелия сосудов среднего и крупного диаметра. Возрастание показателя отражает длительность и тяжесть сосудистого повреждения, развитие воспаления, тромботических явлений. ЦЭК обладает высокой ценностью для ранней диагностики, так как сигнализирует об изменениях в сосудах раньше появления в крови маркеров повреждения миокарда. Количественные показатели десквамации эндотелия и их изменения отражают общую тенденцию повреждения сосудистой стенки при артериальной гипертензии, атеросклерозе, воспалении. По этой причине ЦЭК является наиболее строгим из рассмотренных в исследованиях предиктором неблагоприятных исходов острых сердечно-сосудистых заболеваний. Кроме того, динамика величины ЦЭК отражает различия в патогенезе приступов загрудинной боли у пациентов со стабильной и нестабильной стенокардией.

Прогностическая и клиническая значимость ЦЭК, по-видимому, может быть связана с их самостоятельной ролью в тромбообразовании. Фенотипический анализ ЦЭК у больных ОКС обнаружил повышенную экспрессию тканевого тромбопластина [Mutin M., 1999]. Жизнеспособные ЦЭК, относительно недавно поступившие в кровоток, могут активно способствовать тромбозу сосудов через продукцию протромботических медиаторов (фактор фон Виллебранда, тканевой тромбопластин) и увеличение агрегации нейтрофилов или тромбоцитов (рис. 3).



Рис. 3. Повышенное тромбообразование при десквамации эндотелиоцита.

Примечания: ФАТ – фактор активации тромбоцитов; ФНО – фактор некроза опухоли-альфа; о-ЛПНП – окисленный липопротеин низкой плотности; ИЛ-1 – интерлейкин-1.

Установлено достоверное снижение выживаемости больных АГ, в крови которых выявлены скопления, состоящие из двух ЦЭК (группа 2), из трёх и более эндотелиоцитов (группа 3), по сравнению с пациентами, у которых скопления не обнаруживались (группа 1) (рис. 4).

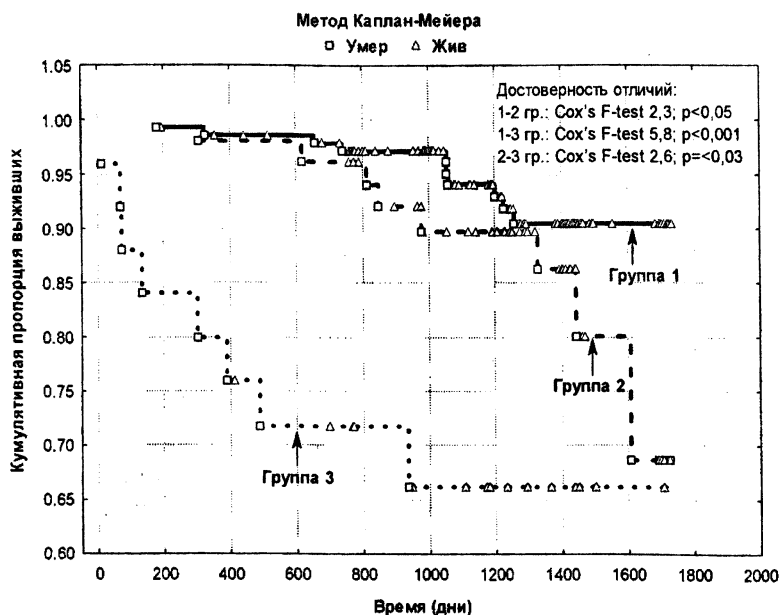


Рис. 4. Сравнение выживаемости больных АГ II степени в зависимости от числа ЦЭК в составе скоплений (по результатам наблюдения в течение $3,3 \pm 1$ лет).

Наличие в крови больных АГ свыше 128 ЦЭК/100 мкл также сопровождалось достоверно более высокой летальностью в этой группе (рис. 5).

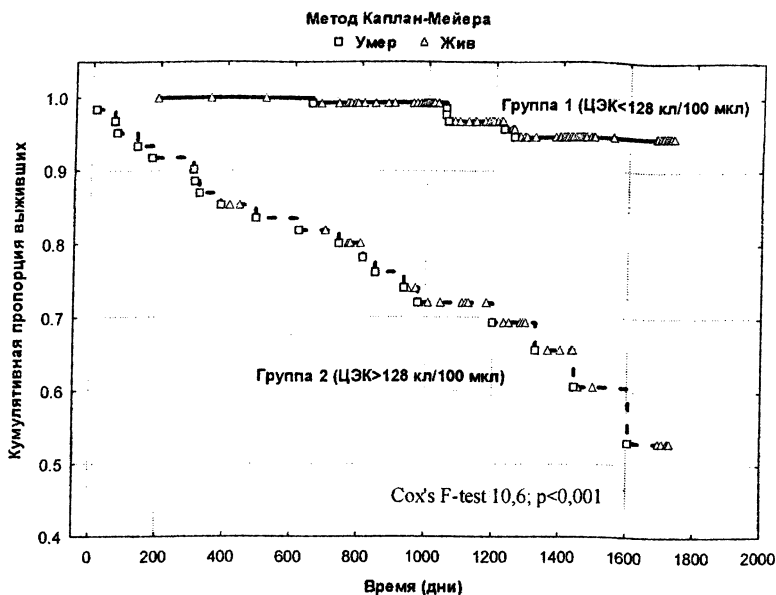


Рис.5. Сравнение выживаемости больных АГ II степени в зависимости от общего числа ЦЭК (по результатам наблюдения в течение $3,3 \pm 1$ лет).

В наших исследованиях были определены пороговые значения числа ЦЭК, ассоциированные с повышением относительного риска (ОР) развития инсультов и инфарктов миокарда, летальных исходов у больных АГ II степени в течение $3,3 \pm 1$ лет наблюдения (табл. 5).

Таблица 5

Пороговые значения числа ЦЭК, ассоциированные с повышением ОР развития инсультов и ИМ, летальных исходов у больных АГ II степени

События	Показатели	Пороговые значения	ОР	ДИ
Инфаркт миокарда	ЦЭК*	≥ 135 кл/100 мкл	7,4	1,9-28,5
Инсульт	ЦЭК*	≥ 126 кл/100 мкл	7,2	2,6-19,8
Летальный исход	ЦЭК*	≥ 128 кл/100 мкл	8,9	2,8-27,3

Примечание: ОР – относительный риск; ДИ – 95% доверительный интервал; * – показатели статистически значимы при $p < 0,01$.

Результаты этих исследований позволили нам, используя логит-регрессионный анализ, создать многофакторные модели прогноза развития событий у больных АГ II степени с учётом повышения числа ЦЭК: летальных исходов (чувствительность модели 78%, специфичность 99%; информационная значимость 96%), инфарктов миокарда (чувствительность модели 76%, специфичность 88%; информационная значимость 78%), инсультов (чувствительность модели 76%, специфичность 92%; информационная значимость 88%).

6. ОСНОВНЫЕ ЦЕЛИ ИССЛЕДОВАНИЯ УРОВНЯ ЦЭК

Изложенное выше позволяет сформулировать основные цели исследования уровня ЦЭК:

1. Оценка тяжести повреждения эндотелия при различных патологических состояниях.
2. Отбор больных, имеющих повреждение эндотелия, для дальнейшего углубленного обследования.
3. В сочетании с другими методами – для прогнозирования острых нарушений коронарного и церебрального кровотока, летальных исходов у больных АГ и другими сердечно-сосудистыми заболеваниями.
4. Контроль за эффективностью проводимой терапии на основании динамики числа циркулирующих в крови эндотелиоцитов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Идентификация ЦЭК имеет значение для количественной оценки тяжести повреждения эндотелия, прогноза исходов и контроля проводимой терапии у больных с заболеваниями сердечно-сосудистой системы, что позволяет рекомендовать более широкое применение этого метода в клинической практике. Изучение свойств ЦЭК может дать ценную информацию о функциональном состоянии эндотелия. Дальнейшее исследование клеточного фенотипа может помочь лучше понять патогенез сосудистых заболеваний и обосновать дифференцированные индивидуализированные лечебные программы.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Augustin H.G., Koziar D.H., Johnson R.C. // Bioessays. – 1994. – Vol. 16. – P. 901-906.
2. Алимов Г.А., Банин В.В., Бобрик И.И. и соавт. // под ред. В.В. Куприянова, И.И. Бобрика, Я.Л. Караганова. Киев: Здоров'я, 1986.
3. Hladovec J. // Arzneimittelforschung. – 1978. – Vol. 28. – P. 982-983.
4. Pool E.H., Dunlop G.R. // Am. J. Cancer. – 1934. – Vol. 21. – P. 99-103.
5. Bouvier C.A., Gaynor E., Cintron J.R. et al. // Thromb. Diath. Haemorrh. – 1970. – Vol. 40. – P. 163.
6. Hladovec J., Rossman P. // Thromb. Res. – 1973. – Vol. 3. – P. 665-674.
7. George F., Poncelet P., Laurent J.C. et al. // J. Immunol. Methods. – 1991. – Vol. 139. – P. 65-75.
8. Dignat-George F., Sampol J. // Eur. J. Haematol. – 2000. – Vol. 65. – P. 215-220.
9. George F., Brisson C., Poncelet P. et al. // Thromb. Haemost. – 1992. – Vol. 67. – P. 147.
10. Bardin N., George F., Mutin M. et al. // Tissue Antigens. – 1996. – Vol. 48. – P. 531.
11. Bardin N., Frances V., Lesaulle G. et al. // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1996. – Vol. 218. – P. 210.
12. Solovey A., Lin Y., Browne P. et al. // N. Engl. J. Med. – 1997. – Vol. 337. – P. 1584.
13. Mahdy Z., Otun H.A., Dunlop W. et al. // J. Physiol. – 1998. – Vol. 508. – P. 609-617.
14. Hladovec J. // Physiol. Bohemoslov. – 1978. – Vol. 27. – P. 140-144.
15. Петришев Н.Н., Беркович О.А., Власов Т.Д. и соавт. // Клин. лаб. диагностика. – 2001. – № 1. – С. 50-52.
16. Stefanec T. // Chest. – 2000. – Vol. 274. – P. L908-L913.
17. Bombeli T., Karsan A., Tait J.F. and Harlan J.M. // Blood. – 1997. – Vol. 90. – P. 2429.
18. Makin A., Chung N.A.Y., Silverman S.H. et al. // Eur. Heart. J. – 2004. – Vol. 25. – P. 371-376.
19. Агеев А.К. // Медицина. – 1969. – С. 143.
20. Gomori G. // Am. J. Clin. Path. – 1946. – Vol. 16. – P. 347-352.
21. Gavrieli X., Sherman Y., Ben-Sasson S.A. // J. Cell. Biol. – 1992. – V. 119. – P. 493.
22. Lucas R., Garcia I., Donati Y. et al. // Eur. J. Immunol. – 1998. – V. 28. – P. 3577-3586.
23. Hladovec J., Prerovsky I. // Cor Vasa. – 1989. – Vol. 31. – P. 51-54.
24. Mutin M., Canavy I., Blann A. et al. // Blood. – 1999. – Vol. 93. – P. 2951-2958.
25. Ross R. // Nature. – 1993. – Vol. 362. – P. 801.
26. Алмазов В.А., Благосклонная Я.В., Шляхто Е.В. и соавт. // Артериальная гипертензия. – 1997. – Т. 3, № 1. – С. 7-17.
27. Nadar S.K., Lip G.Y., Lee K.W. et al. // Thromb. Haemost. – 2005. – Vol. 94, № 4. – P. 707-712.
28. Libby P., Ridkin P.M., Maseri A. // Circulation. – 2002. – Vol. 105. – P. 1135-1143.
29. Davies M.J. // Am. J. Cardiol. – 2001. – Vol. 88. – P. 2F-9F.
30. Wang C., Li H., Fu P. et al. // Clin. Hemorheol. Microcirc. – 2005. – Vol. 32, № 4. – P. 287-296.
31. Yang L.X., Zhu S.J. // Zhonghua Nei Ke Za Zhi. – 1993. – Vol. 32, № 12. – P. 816-818.
32. Quilici J., Banzet N., Paule P. et al. // Circulation. – 2004. – Vol. 110. – P. 1586-1591.
33. Chong A.Y., Blann A.D., Patel J. et al. // Circulation. – 2004. – Vol. 110. – P. 1794-1798.

Научное издание

**Козловский Владимир Иосифович, Солодков Александр Петрович,
Мяделец Олег Данилович, Акулёнок Александр Владимирович**

МЕТОДЫ ОПРЕДЕЛЕНИЯ ЧИСЛА ЦИРКУЛИРУЮЩИХ В КРОВИ ЭНДОТЕЛИОЦИТОВ

Методические рекомендации



Технический редактор И.А. Борисов

Компьютерная вёрстка А.В. Акулёнок

Подписано в печать 20.11.08 Формат бумаги 64х84 1/16
Бумага типографская № 2 Гарнитура ТАИМС Усл. печ. л. 1,69
Уч.-изд. л. 0,91 Тираж 100 Заказ № 909
Издатель и полиграфическое исполнение УО «Витебский государственный
медицинский университет»
ЛИ № 232 от 30.04.04

Отпечатано на ризографе в Витебском государственном медицинском университете
210602, Витебск, пр. Фрунзе, 27
Тел (8-0212)261966